

Asociación entre Seropositividad al Virus de la Diarrea Viral Bovina, *Leptospira interrogans* y *Neospora caninum*, y la Ocurrencia de Abortos en Fincas de Pequeños Productores del Cordón Lechero de Boyacá, Colombia

ASSOCIATION BETWEEN SEROPOSITIVITY TO BVD VIRUS, *Leptospira interrogans* AND *Neospora caninum* AND ABORTIONS IN SMALL HOLDER FARMS IN THE DAIRY BELT OF BOYACÁ, COLOMBIA

Giovanni Moreno Figueredo^{1,5}, Efraín Benavides Ortiz², Bernardo Guerrero³,
Anastasia Cruz Carrillo⁴

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar mediante un estudio de casos y controles, la asociación entre seropositividad a algunos agentes infecciosos y el reporte de alteraciones reproductivas en animales y fincas de la región de Boyacá, Colombia. Se consideró como «caso» a fincas (n=5) con una frecuencia de ocurrencia de abortos superior al 10% y como «control» (n=10) a fincas con frecuencias de aborto menor de 3%. En cada finca, se recolectaron muestras de sangre de 10 novillas, 10 vacas de 1^{er} y 2^{do} parto y 10 vacas de >2 partos. Se utilizó la prueba de seroneutralización para la detección de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina (DVB), la prueba de microaglutinación para siete serovares de *Leptospira interrogans* y la prueba de inmunofluorescencia indirecta para *Neospora caninum*. Las mayores seropositividades fueron para DVB (76.4%, 15/15 fincas), serovar *Hardjo* (23.1%, 14/15 fincas) y *N. caninum* (10.7%, 12/15 fincas), sin diferencias significativas entre fincas casos y fincas control. Se comparó el resultado serológico de cada animal como factor de riesgo frente a la condición de aborto encontrando un Odds Ratio (OR) de 10.11 para DVD y 3.88 para *Hardjo*. No se encontró asociación como factor de riesgo de abortos para los demás patógenos.

Palabras clave: aborto; ganado bovino; enfermedades infecciosas; enfermedades de la reproducción; factores de riesgo

Castellanos, Tunja, Colombia

² Centro de Investigación en Medicina y Reproducción Animal – CIMRA, Programa de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia

³ Laboratorios Calier Andes, Bogotá, Colombia

⁴ Grupo de Investigación GIBNA, Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Bogotá, Colombia

⁵ E-mail: gmorenof@jdc.edu.co

Recibido: 9 de diciembre de 2016

Aceptado para publicación: 19 de junio de 2017

ABSTRACT

The aim of this study was to determine, through a case-control study, the association between sero-positivity to some infectious agents and the report of reproductive alterations in animals and farms in Boyacá, Colombia. «Case» farms (n=5) were considered those with a frequency of abortions higher than 10% and as «control» farms (n=10) those with abortion frequencies lower than 3%. In each farm, blood samples were collected from 10 heifers, 10 cows from 1st and 2nd calving and 10 cows from >2 calvings. It was used the seroneutralization test for the detection of antibodies against bovine viral diarrhea virus (DVB), the microagglutination test for seven serovars of *Leptospira interrogans* and the indirect immunofluorescence test for *Neospora caninum*. The highest seropositivity were for DVB (76.4%, 15/15 farms), serovar *Hardjo* (23.1%, 14/15 farms) and *N. caninum* (10.7%, 12/15 farms) and without significant differences between case farms and control farms. The serological result of each animal as a risk factor against the abortion condition was evaluated, finding an Odds Ratio (OR) of 10.11 for DVD and 3.88 for *Hardjo*. No association was found as a risk factor for abortions for other pathogens.

Key words: abortion; cattle; infectious diseases; reproductive diseases; risk factors

INTRODUCCIÓN

En la medicina y reproducción bovina, se entiende como enfermedad reproductiva, aquella enfermedad que imposibilita o dificulta la fecundación, el mantenimiento de una gestación completa o la obtención de una cría con posibilidades de vida, o bien, aquella enfermedad que afecta los parámetros reproductivos propios del sistema de producción que se maneje (Anderson, 2007). En consecuencia, al producirse infertilidad, se observa aumento de los días abiertos y del intervalo entre partos, además de poder observar muertes embrionarias, abortos, malformaciones fetales y nacimiento de terneros débiles. De manera paralela, algunas de ellas conducen a cuadros clínicos que involucran órganos o sistemas distintos al reproductivo, capaces de afectar a machos y hembras de cualquier edad, conduciendo en algunos casos a la muerte. Estas alteraciones no solamente afectan la salud del hato, sino que ejercen influencia directa, sobre la producción, teniendo en algunos casos importancia zoonótica (Anderson 2007).

Las metas del plan estratégico de la ganadería colombiana (Fedegan, 2006) indican que las bajas tasas de natalidad continúan siendo una de las principales limitaciones para el desarrollo de la industria ganadera; sin embargo, se desconocen componentes epidemiológicos de los agentes causantes de las principales enfermedades de la reproducción bovina, siendo la mayoría de las investigaciones sobre el tema dirigidas al reporte de los agentes causales (Vera *et al.*, 2006; Vera y Betancur, 2008) o de estudios epidemiológicos transversales de prevalencia (Griffiths *et al.*, 1982; Morrison *et al.*, 1991; Betancur *et al.*, 2007), los cuales no permiten determinar relaciones causa - efecto (Otte *et al.*, 1995; Thrusfield, 2007).

El diagnóstico preciso de las causas de aborto y de alteraciones reproductivas de los bovinos es complejo y requiere de la cooperación entre el veterinario de campo y el laboratorio de diagnóstico veterinario (Anderson, 2007), lo cual debe ser tamizado a través de la evidencia epidemiológica (Otte *et al.*, 1995; Gröhn y Rajala-Schultz, 2000). Las causas infecciosas asociadas al aborto

bovino incluyen agentes bacterianos (leptospirosis y brucelosis, principalmente), virales (diarrea viral bovina [DVB]), micóticos y protozoos (*Neospora caninum*) (Anderson, 2007).

El objetivo de esta investigación fue determinar, mediante un estudio epidemiológico retrospectivo de casos y controles (Otte *et al.*, 1995; Thrusfield, 2007), la asociación entre seropositividad a algunos agentes infecciosos y el reporte de alteraciones reproductivas en animales y fincas de pequeños productores de Boyacá, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el cordón lechero de Boyacá, el cual abarca las provincias de Centro, Sugamuxi y Tundama del departamento de Boyacá, Colombia, y entre otros, los municipios de Ventaquemada, Oicatá, Tuta, Tunja, Duitama, Sotaquirá, Paipa, Soracá e Iguaque (Ortiz *et al.*, 2005; Dehaquiz *et al.*, 2012).

Se realizó un estudio epidemiológico de casos y controles (Thrusfield, 2007), donde las fincas participantes fueron seleccionadas por conveniencia con base en su voluntad de cooperación, el cumplimiento de requerimientos metodológicos y de aporte de información del estudio. Las fincas incluidas en el estudio correspondieron a medianos productores con 15-30 animales y 20-30 ha destinadas a ganadería. Son fincas de mediana tecnificación en las que se practica inseminación artificial y donde algunas tienen ordeño mecánico. La Figura 1 muestra los municipios del cordón lechero de Boyacá que incluyeron fincas de pequeños ganaderos que participaron en el estudio.

Se consideraron como «caso» aquellas fincas con una frecuencia de ocurrencia de abortos superior al 10% (5 fincas) y se catalogó como fincas «controles» (10 unidades de producción) aquellas que reportaban la

ocurrencia de ese evento con una frecuencia inferior al 3% (Otte *et al.*, 1995). En cada finca se recolectó información complementaria sobre inventario ganadero, eventos de salud y producción (nacimientos, enfermedad, abortos, etc.), y se evaluó la condición reproductiva de los animales mediante palpación rectal de los órganos reproductivos y el historial reproductivo de la finca.

Se recolectaron muestras de sangre de 10 novillas, de 10 vacas entre el primer y segundo parto y de 10 vacas de tres o más partos en cada finca participante (Hathaway *et al.*, 1986). Las muestras fueron centrifugadas y el suero resultante fue almacenado a -70 °C y enviado a la Universidad de Parma, Italia, donde se realizaron las pruebas serológicas. El laboratorio de esta universidad es considerado laboratorio de referencia para la Unión Europea para los agentes patógenos en estudio.

Las muestras fueron analizadas para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina (DVD), *Leptospira interrogans* y *Neospora caninum*. Para el virus de DVB se utilizó la prueba de seroneutralización (SN), donde se prepararon diluciones de cada suero problema desde 1:2 hasta 1:256, según Reinhard *et al.* (2001). Los títulos serológicos se convirtieron a una escala continua en logaritmo en base 2 del recíproco de la dilución utilizada, considerando un suero positivo aquel que presente títulos mayores o iguales a ocho y como suero negativo aquel con títulos menores a cuatro.

Para el diagnóstico de serovares de *L. interrogans* se utilizó la prueba de microaglutinación lisis, donde cada suero problema fue procesado por duplicado y en diluciones 1:25, 1:50 y 1:100. Se trabajó con los serovares *L. interrogans*, *L. hardjobovis*, *L. pomona*, *L. bratislava*, *L. gryppothyphosa*, *L. canicola* y *L. tarassovi* (OMS, 1987). Los serovares seleccionados fueron los de mayor reporte en el país y que, además, correspon-



Figura 1. Municipios del cordón lechero de Boyacá con fincas participantes del estudio

den a los serovares incluidos en las vacunas utilizadas contra este patógeno.

El diagnóstico de *Neospora caninum* se realizó mediante una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando como antígeno a taquizoitos del parásito (Conrad *et al.*, 1993).

El análisis estadístico incluyó la preparación de tablas de contingencia comparando positivos y negativos a cada agente etiológico en las fincas casos y fincas controles, así como la comparación de proporciones mediante Chi cuadrado, considerando un nivel de confianza del 95%. Los factores de riesgo, principalmente la razón de probabilidades (Odds Ratio, OR) se estimaron con la ayuda del programa WinEpi (de Blas *et al.*, 2000). Un segundo análisis comparó el riesgo de ocurrencia de aborto en animales positivos y negativos a cada prueba serológica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se recolectaron muestras de 450 animales de 15 fincas (5 casos, 10 controles). De estos, 58 animales habían presentado el evento de aborto. La seropositividad para DVB fue de 76.4% para el total de animales evaluados, para el serovar *hardjo* fue 23.1% en 14 fincas y para *N. caninum* fue 10.7% en 12 de las 15 fincas, pero sin que hubiera diferencias significativas en las frecuencias de positividad para cada agente etiológico entre fincas caso y fincas control.

La frecuencia de positividad para el virus de DVB en las fincas caso fluctuó entre 53.3 y 100% (promedio 76.0%), mientras en las fincas control varió entre 30 y 100% (promedio 76.7%) (Cuadro 1), sin diferencias entre fincas caso y fincas control ($\chi^2 = 0.014$; $p = 0.906$).

Cuadro 1. Comparación de la frecuencia de positividad serológica al virus de la diarrea viral bovina (DVD) en las fincas caso y fincas control en el cordón lechero de Boyacá (30 muestras por finca)

Finca	Grupo	Positivos	
		n	%
1	Caso	30	100.0
2	Caso	27	90.0
3	Caso	16	53.3
4	Caso	18	60.0
5	Caso	23	76.7
6	Control	23	76.7
7	Control	9	30.0
8	Control	28	93.3
9	Control	24	80.0
10	Control	27	90.0
11	Control	17	56.7
12	Control	30	100.0
13	Control	23	76.7
14	Control	22	73.3
15	Control	27	90.0
Total		344	76.4

La mayor frecuencia de seropositividad se observó para el vDVB, seguido por *L. hardjo* y *N. caninum* (Cuadro 2). Para el caso de *L. hardjo*, la seropositividad en las fincas caso fue de 25.3% (0-50%) y en las fincas control de 22.0% (3.3-46.6%), sin diferencias significativas entre el tipo de finca. Las frecuencias de positividad para los otros serovares fueron bajas, mientras que fue nula para *L. tarassovi* (Cuadro 2).

El promedio de seropositividad para *N. caninum* fue de 10.7%, tanto para las fincas caso como para las fincas control. En las primeras, los promedios de seropositividad por finca fluctuaron entre 0 y 20% y en las fincas control entre 0 y 23.3%.

Ninguna de las fincas participantes declaró utilizar vacunas para el complejo reproductivo bovino (IBR, DVB, *Leptospira*), lo que coincide con observaciones previas de fincas de la región, donde solo

se emplean vacunas contra fiebre aftosa y brucelosis, conducta asociada con las campañas oficiales (Ortiz *et al.*, 2005). Esto indica que los anticuerpos hallados en los animales se debieron a infecciones de campo.

Reportes previos en Colombia sobre la prevalencia de reactores serológicos al virus de DVB indican 47.2% (Griffiths *et al.*, 1982), y aun menores, como el 6.4% en el 49% de las fincas en la región Caribe (Morrison *et al.*, 1991), y más recientemente, de 29.4% en el municipio de Montería (Betancur *et al.*, 2007). Por otro lado, en el trópico alto colombiano, se destaca el reporte de 83% de toros reactores en la Sabana de Bogotá (Góngora *et al.*, 1995). Esto parece indicar que este virus se transmite más fácilmente entre animales en las condiciones de trópico alto; sin embargo, las fincas con problemas de abortos (fincas caso) presentaron niveles de seropositividad similares al de las fincas con baja ocurrencia de aborto (fincas control), de allí que la prueba de asociación no permitió inferir que este agente etiológico fuera un factor de riesgo en el modelo basado en la clasificación de la finca.

Con relación a *Leptospira*, los resultados coinciden con lo que se afirma respecto a que el serovar *Hardjo* es el de más frecuente transmisión en el trópico colombiano (Otte, 1992). El estudio de Griffiths *et al.* (1982), llevado a cabo en Colombia hace 35 años indicó una prevalencia de 21.7% en todas las regiones y de 14.4% en la región andina (Griffiths *et al.*, 1982); luego en el estudio en fincas de Córdoba y Sucre (Morrison *et al.*, 1991) se presenta una evidencia de contacto con el patógeno en el 100% de las fincas y en 41.8% de los animales. Un estudio longitudinal prospectivo de dos años de seguimiento demostró la complejidad de las dinámicas de transmisión de *Hardjo* en los ecosistemas del trópico bajo y donde se demostró asociación entre el evento seropositividad a este patógeno y alteraciones reproductivas (Otte, 1992). Un segundo estudio llevado a cabo en el piedemonte Llanero demostró la bondad del uso de un abordaje de estudio de casos y controles, don-

Cuadro 2. Porcentaje de reactores serológicos a diversos agentes infecciosos en las fincas caso y las fincas control en el cordón lechero de Boyacá (30 muestras por finca)

Agente patógeno	Fincas caso	Fincas control	X ²	p
DVD	76.0	76.7	0.027	0.869
<i>Leptospira</i>				
<i>Hardjo</i>	25.3	22.0	0.613	0.464
<i>Pomona</i>	3.3	2.0	n.v.	
<i>Bratislava</i>	1.3	0.3	n.v.	
<i>Gryppothyphosa</i>	3.3	0	n.v.	
<i>Canicola</i>	4.7	2.7	1.230	0.267
<i>Neospora caninum</i>	10.7	10.7	n.a.	

n.v. Cálculo de Chi cuadrado no válido por alto porcentaje de celdas con valor esperado inferior a cinco
n.a. La prueba no aplica cuando ambos porcentajes son idénticos

Cuadro 3. Frecuencia de seropositividad a diversos agentes infecciosos en animales que han abortado y animales sin historia de aborto, y factores de riesgo en el cordón lechero de Boyacá.

Agente patógeno	Positivos con aborto	Positivos sin aborto	OR	LC95%
DVD	96.6	73.5	10.11	2.4-42.2
<i>Leptospira</i>				
<i>Hardjo</i>	48.3	19.4	3.88	2.2-6.9
<i>Pomona</i>	5.2	2.0	2.65	0.7-10.2
<i>Canicola</i>	6.9	2.8	2.57	0.8-8.3
<i>Neospora caninum</i>	10.3	10.7	0.96	0.4-2.4

de se encontró una frecuencia significativamente mayor de reactores positivos en fincas que habían experimentado altas tasas de abortos y nacimiento de terneros débiles (Otte *et al.*, 1995).

N. caninum es de reciente descripción en estudios nacionales. Una evaluación serológica basada en una prueba de ELISA comercial dio como resultado 54% de

positividad (Zambrano *et al.*, 2001) y en otro estudio en el trópico bajo (Córdoba) en vacas con problemas reproductivos se encontró una seropositividad de 10.2% (Oviedo *et al.*, 2007). Ese resultado es muy similar al encontrado en esta investigación, en la que, además, no hubo evidencia epidemiológica de que esta coccidia esté implicada como causa de aborto en fincas con tasas de aborto superiores al 10%.

Debido a que no se pudo demostrar asociación causal entre abortos y los agentes etiológicos estudiados, basado en un modelo de discriminación de fincas casos y fincas control, se analizaron los resultados considerando como factor de riesgo el ser positivo serológicamente a un agente mientras que la enfermedad a considerar fue la ocurrencia de abortos en los animales individuales, independientemente de la finca a la que perteneciera. Los resultados del análisis indicaron un OR de 10.1 para el virus de DVB (Límites de confianza del 95% [LC95%]: 2.4-42.1) y de 3.88 para Hardjo (LC95%: 2.2-6.9); resultados que indican asociación entre las dos variables consideradas. En los otros patógenos en estudio no se encontró asociación como factor de riesgo de abortos en la región (Cuadro 3).

CONCLUSIONES

- El virus de la diarrea viral bovina (DVD) y el serovar *Hardjo* de *Leptospira interrogans* fueron factores de riesgo para la ocurrencia de abortos en animales de la región de Boyacá, Colombia, más no así *Neospora caninum* y otros serovares de *Leptospira*.
- La categorización por fincas caso y control no permitió detectar factores de riesgo en cuanto a la categorización de fincas con problemas de aborto o fincas consideradas normales.

LITERATURA CITADA

1. **Anderson ML. 2007.** Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology* 68: 474-486. doi:10.1016/j.theriogenology. 2007. 04.001
2. **Betancur CA, Gogorza LM, Martinez FG 2007.** Seroepidemiología de la diarrea viral bovina en Montería (Córdoba, Colombia). *Analecta Vet* 27(2): 11-16.
3. **Conrad PA, Sverlow KW, Anderson ML, Rowe J, BonDurant R, Tuter G, Breitmeyer R, et al. 1993.** Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diagn Invest* 5: 572-578. doi: 10.1177/104063879300500412
4. **De Blas N, Ortega C, Frankena K, Noordhuizen J, Thrusfield M. 2000.** Win Episcopo 2.0. A software for quantitative veterinary epidemiology Red Ratio, Epidecon. Edinburgh, UK: University of Edinburgh.
5. **Deháquíz MJE, Bermúdez CLT, Rodríguez CLF. 2012.** Environmental management model for small dairies in the Industrial Corridor of Boyaca (Colombia). *Agron Colomb* 30: 141-148.
6. **[FEDEGAN] Federación Colombiana de Ganaderos. 2006.** Plan estratégico de la ganadería colombiana 2019. Bogotá: Ed Sanmartín Obregón. 273 p.
7. **Góngora A, Villamil L, Vera V, Ramírez G, Parra J. 1995.** Diagnóstico de las principales enfermedades reproductivas en toros de la sabana de Bogotá. Énfasis en rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB). *Rev Fac Med Vet Zootec* 42(1): 37-42.
8. **Griffiths IA, Villamil LC, Gallego MI. 1982.** Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia. Bogotá, Colombia: ICA. 154 p.
9. **Gröhn YT, Rajala-Schultz PJ. 2000.** Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 60-61: 605-614. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00085-3
10. **Hathaway SC, Little TW, Pritchard DG 1986.** Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in bovine populations. *Vet Rec* 119: 84-86.
11. **Morrison R, Navarrete M, Orjuela J, Otte E. 1991.** Salud y productividad en bovinos de la Costa Norte de Colombia. *Rev Mundial Zootec* 68: 43-51.
12. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 1987.** Leptospirosis. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio. 30: 46

13. **Ortiz R, Benavides E, Ortiz D. 2005.** Estrategias de medicina veterinaria preventiva utilizadas en ganaderías del cordón lechero de Boyacá. *Rev Acovez* 35: 10-12.
14. **Otte J. 1992.** Diagnóstico epidemiológico de la leptospirosis bovina. En: Mem Simposio Internacional sobre estado actual y perspectivas del diagnóstico en salud y producción animal. Santafé de Bogotá, Colombia: ICA- GTZ.
15. **Otte MJ, Ravenborg T, Hüttner K. 1995.** A pilot study of elevated abortion and stillbirth ratios in cattle in the foothills of the eastern plains of Colombia. *Prev Vet Med* 22: 103-113. doi: 10.1016/0167-5877(94)00394-X
16. **Oviedo ST, Betancur HC, Mestra PA, González TM, Reza GL, Calonge GK. 2007.** Estudio serológico sobre neosporosis en bovinos con problemas reproductivos en Montería, Córdoba, Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 12: 929-933.
17. **Reinhardt G, Carrasco L, Tadich N, Riedemann S. 2001.** Comparación entre dos técnicas de diagnóstico para diarrea viral bovina (Dvb) en 50 predios de la X Región, Chile: seroneutralización y enzimoimmunoensayo indirecto (Elisa-I). *Arch Med Vet* 33: 173-183. doi: /10.4067/S0301-732X2001000200006
18. **Thrusfield M. 2007.** Veterinary epidemiology. 3rd ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. 335 p.
19. **Vera V, Betancur C. 2008.** Aislamiento del virus herpes bovino tipo 1 en bovinos del departamento de Córdoba - Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 13: 1495-1503.
20. **Vera VJ, Ramírez GC, Villamil LC, Moreno de Sandino M, Jaime J. 2006.** Biología molecular, epidemiología y control de la rinotraqueítis bovina infecciosa y de la diarrea viral bovina. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 80 p.
21. **Zambrano J, Cotrino V, Jimenez C, Romero M, Guerrero B. 2001.** Evaluación serológica de *Neospora caninum* en bovinos en Colombia. *Rev Acovez* 26: 5-10.